

## FORMULASI KONSORSIUM MIKROBA ASAL PERTAMBANGAN MINYAK SIAK RIAU YANG EFEKTIF DALAM MENDEGRADASI SENYAWA HIDROKARBON

Joko Prayitno<sup>1</sup>, Radianti Prisha<sup>2</sup>, Sri Herlina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pusat Teknologi Lingkungan, BPPT, Lt. 19 Gd. 2 BPPT Jl. MH Tamrin No.8 Jakarta

<sup>2</sup>Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Al Azhar, Jl. Sisingamangaraja, Jakarta

<sup>3</sup>Balai Teknologi Lingkungan, BPPT, Gd. 412 Puspiptek Serpong Tangerang Selatan

### Abstrak

Uji degradasi minyak dari enam isolat bakteri (P1, P2, P3, P4, P5 dan P6) dan konsorsiumnya (K1, K2 dan K3) telah dilakukan dalam skala laboratorium. Isolat-isolat bakteri tersebut berasal dari tanah tercemar minyak di sumur pertambangan minyak di Siak, Riau. Konsentrasi awal minyak yang digunakan dalam kultur percobaan adalah 2.4 g/100 ml. Nilai *Total Petroleum Hydrocarbon* (TPH) diukur pada hari ke-12 percobaan. Dari enam isolat yang dicoba, isolat P2 dan P6 memiliki nilai TPH terendah yaitu masing-masing sebesar 0.44 g (atau terjadi penurunan TPH sebesar 69.9%) dan 0.49 g (65.5% penurunan TPH). Isolat P2 dan P6 ini kemudian dipilih dan dikombinasikan untuk menentukan formulasi isolat terbaik dalam percobaan konsorsium. Kombinasi isolat bakteri yang dicoba dalam percobaan konsorsium adalah K1 (campuran dari isolat P2 dan P6 dengan rasio 1:1), K2 (campuran dari isolat P1, P2, P3, P4, P5 dan P6 dengan rasio 1:1:1:1:1:1) dan K3 (campuran dari isolat P1, P2, P3, P4, P5 dan P6 dengan rasio 1:3:1:1:1:3). Konsentrasi awal minyak yang digunakan dalam percobaan adalah 2.7 g/100 ml. Nilai TPH terendah ditemukan dalam kultur K1 yaitu sebesar 0.43 g, atau terjadi penurunan nilai TPH sebesar 84.2%. Nilai TPH pada kultur K3 adalah 0.68 g atau terjadi penurunan sebesar 78%. Nilai TPH ini lebih tinggi dari K1, namun lebih rendah dari K2 ataupun kultur tunggal P6. Hasil dari percobaan ini menunjukkan bahwa tingkat degradasi minyak dapat ditingkatkan dengan menggunakan campuran dari isolate-isolat tertentu.

**Kata kunci:** bioremediasi minyak, biodegradasi, konsorsium mikroba

### Abstract

*Laboratory experiments have been conducted to test the effectiveness of six bacterial isolates (P1, P2, P3, P4, P5 and P6) and their consortia (K1, K2 and K3) to degrade crude oil. The bacteria were obtained from the oil-contaminated soil around well sites in Siak, Riau. The initial amount of crude oil added into the culture media was 2.4 g/100ml. Total petroleum hydrocarbon (TPH) was determined after 12 days of culture. Of six isolates, isolate P2 and P6 had the lowest TPH value after 12 days of culture, i.e. 0.44 g (69.9% oil reduction) and 0.49 g (65.5% oil reduction), respectively. Therefore, isolate P2 and P6 were selected and mix to determine the best combination of bacterial*

*strains in a consortium. The combinations of bacterial isolates representing three mix cultures were K1 (mix culture of isolate P2 and P6 with 1:1 ratio), K2 (mix culture of isolate P1, P2, P3, P4, P5 and P6 with 1:1:1:1:1:1 ratio), and K3 (mix culture of isolate P1, P2, P3, P4, P5 and P6 with 1:3:1:1:1:3 ratio). The initial amount of crude oil added into the cultures was 2.7 g. The lowest TPH value among the three mix cultures was found in K1 i.e. 0.43 g, or there was a 84.2% oil reduction. K3 had a higher TPH value than K1 (0.60 g or 78% reduction), but had a lower value than K2 or the single culture P6. Results from this study showed that oil degradation rate can be increased using mix culture of selected strains.*

**Key words:** oil bioremediation, biodegradation, microbe consortium

## 1. PENDAHULUAN

Kegiatan penambangan minyak bumi di berbagai wilayah di Indonesia berpotensi menimbulkan pencemaran karena adanya tumpahan minyak selama proses penambangan. Minyak bumi mengandung berbagai macam zat berbahaya seperti senyawa parafin, aromatik, resin dan aspalten<sup>1)</sup>. Dampak pencemarannya adalah keracunan pada organisme, mengganggu penyerapan hara pada tanaman dan mempengaruhi keseimbangan ekosistem sekitar.

Teknologi yang banyak digunakan untuk menurunkan konsentrasi bahan pencemar seperti minyak bumi di lahan tercemar adalah bioremediasi. Berdasarkan KepMenLH No. 128 tahun 2003, bioremediasi didefinisikan sebagai aplikasi bioteknologi yang memanfaatkan makhluk hidup khususnya mikroba untuk menurunkan konsentrasi atau daya racun bahan pencemar<sup>2)</sup>.

Dalam teknik bioremediasi, setiap bakteri yang bekerja untuk meremediasi minyak mempunyai peran sendiri-sendiri di habitat alamnya. Bioremediasi dapat dilakukan dengan dua teknik, yaitu biostimulasi dan bioaugmentasi. Teknik biostimulasi merupakan pemberian nutrisi dan oksigen ke dalam tanah dan air yang tercemar untuk meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas mikroba asli (*indigenous*) yang ada di tanah atau air tersebut<sup>3)</sup>. Sedangkan bioaugmentasi adalah penambahan mikroba

yang dapat membantu menghilangkan kontaminan tertentu pada tanah atau air tercemar.

Pada teknik bioaugmentasi diperlukan mikroba yang memiliki kinerja baik untuk mendegradasi senyawa polutan. Mikroba tersebut biasanya diperoleh dari lingkungan yang tercemar minyak. Pada lingkungan yang telah lama tercemar dimungkinkan terdapat bakteri pendegradasi minyak secara alami, bersaing maupun bercampur dengan bakteri lainnya<sup>4)</sup>. Teknik bioaugmentasi biasanya digunakan untuk mempercepat proses degradasi oleh mikroba-mikroba yang efektif.

Dalam teknik bioaugmentasi, isolasi dan seleksi mikroba merupakan langkah awal untuk mendapatkan bakteri yang berperan dan berpotensi untuk dikembangkan dan dimanfaatkan secara khusus dalam penanganan pencemaran minyak. Prosedur isolasi bakteri yang dilakukan biasanya hanya dapat mengisolasi bakteri pendegradasi minyak bumi yang mendominasi kultur, yaitu bakteri yang pertama mendegradasi minyak bumi dan mampu mencapai konsentrasi sel tinggi dengan cepat<sup>5)</sup>.

Pada penelitian ini, kemampuan degradasi minyak dari beberapa isolat bakteri yang diperoleh dari tanah tercemar minyak di wilayah pertambangan BOB PT Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu, Riau telah diuji di laboratorium. Dari percobaan ini diperoleh dua isolat terbaik dalam mendegradasi minyak yaitu P2 dan P6.

Berdasarkan studi sebelumnya diketahui bahwa kinerja konsorsium mikroba lebih baik dari pada kinerja isolat tunggal<sup>6,7,8)</sup>. Karena itu kinerja campuran beberapa isolat tunggal yang membentuk konsorsium juga diuji dalam penelitian ini. Kombinasi dari campuran mikroba kedua isolat P2 dan P6 terlihat paling baik dalam mendegradasi minyak.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1. Isolat dan Karakteristik Bakteri

Isolat yang digunakan berasal dari tanah tercemar minyak mentah dari wilayah pertambangan minyak BOB PT Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu, Riau, yaitu isolat P1, P2, P3, P4, P5 dan P6. Sedangkan jenis konsorsium yang dicoba adalah campuran dari sebagian atau seluruh isolat tunggal di atas. Karakteristik koloni dari masing-masing isolat dilakukan secara visual, sedangkan bentuk sel diamati dengan mikroskop setelah pewarnaan Gram.

### 2.2. Media Tumbuh Bakteri

Masing-masing isolat ditumbuhkan di media Nutrien Agar (NA) selama 2 hari sebelum dilakukan percobaan. Media NA terdiri dari 3,0 g *meat extract*, 5 g pepton, dan 0,5 g NaCl dalam 1000 ml akuades<sup>9)</sup>. Media Nutrient Broth (NB) digunakan untuk memperbanyak sel untuk percobaan. Karakterisasi isolat dilakukan sesuai dengan metode yang dijelaskan dalam Cappucino dan Sherman<sup>9)</sup>.

Media tumbuh yang digunakan dalam percobaan adalah media Bushnell dan Haas (BH)<sup>10)</sup>. Media BH dibuat dengan melarutkan 0,41 g  $\text{MgSO}_4$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,08 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g  $\text{CaCl}_2$ , dan 1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dalam 1000 ml akuades. Minyak mentah untuk pengujian diperoleh dari daerah pertambangan minyak BOB PT Bumi Siak Pusako – Pertamina Hulu, Riau.

### 2.3. Uji Degradasi Minyak

Percobaan yang dilakukan terdiri dari 2 bagian, yaitu percobaan dengan menggunakan isolat tunggal dan percobaan dengan menggunakan konsorsium. Masing-masing percobaan terdiri dari 2 ulangan. Jenis isolat tunggal yang dicoba adalah isolat P1, P2, P3, P4, P5 dan P6. Sedangkan konsorsium yang dicoba adalah campuran isolat P2 dan P6 dengan perbandingan 1:1 (K1), campuran dari isolat P1, P2, P3, P4, P5 dan P6 dengan perbandingan masing-masing isolat 1:1:1:1:1:1 (K2), dan campuran dari isolat P1, P2, P3, P4, P5 dan P6 dengan perbandingan 1:3:1:1:1:3 (K3). Untuk percobaan konsorsium, kultur tanpa penambahan bakteri (K0) digunakan sebagai kontrol, dan kultur isolat tunggal P6 (P6) digunakan sebagai pembanding.

Masing-masing isolat ditumbuhkan terlebih dahulu di media NA pada suhu 29°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh digunakan sebagai bahan percobaan selanjutnya. Bakteri yang berasal dari koloni tunggal di media NA dikulturkan kembali pada 50 ml media NB di atas shaker pada suhu kamar selama 18 jam. Kemudian kultur bakteri tersebut disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3500 rpm. Pelet yang didapat disuspensikan dalam 10 ml media BH. Jumlah sel dalam suspensi ditetapkan secara tidak langsung dengan mengukur tingkat absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Uji degradasi dilakukan dalam labu erlenmeyer yang berisi 100 ml media BH yang berisi 2% (v/v) minyak mentah asal sumur minyak Riau. Nilai OD suspensi bakteri untuk setiap isolat atau konsorsium di awal percobaan ditetapkan sebesar 0.01. Kultur diinkubasi pada suhu ruang dan digoyang di atas shaker pada kecepatan 180 rpm selama 12 hari. Tingkat degradasi minyak pada hari ke-0, 3, 6, 9 dan 12 ditentukan dengan mengukur nilai absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer. Sebelum

dilakukan pengukuran, 4 ml larutan kultur disentrifugasi selama 10 menit untuk memisahkan larutan dari sel-sel bakteri. Selain itu, jumlah sel dalam kultur ditetapkan dengan metode Total Plate Count (TPC). Total minyak sisa (nilai TPH) diukur pada akhir percobaan di hari ke-12. Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji t-Test pada taraf  $P < 0.05$ , untuk melihat perbedaan di antara perlakuan.

## 2.4. Analisis Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)

Kadar minyak yang tersisa dalam media atau nilai TPH setelah akhir percobaan diukur dengan metode gravimetri. Sebelum diekstraksi, kultur disentrifugasi selama 10 menit untuk memisahkan larutan dari sel-sel bakteri. Larutan yang telah disentrifugasi dimasukkan kedalam corong pisah, ditambahkan 50 ml pelarut heksan, kemudian dikocok selama 15 menit. Setelah corong pisah didiamkan beberapa saat, minyak yang larut dalam heksan terpisah dari air. Air dibuang, sedangkan lapisan minyak dan heksan disaring dengan menggunakan kertas saring yang sudah ditambahkan 0,5 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Hasil saringan ditampung dalam labu destilasi yang telah diketahui beratnya. Labu destilasi dipanaskan pada suhu  $80^\circ\text{C}$  sampai heksan habis menguap dan yang tersisa hanya minyak. Labu destilasi tersebut diangkat dan dikeringkan dalam oven selama 2 jam. Setelah 2 jam di oven, labu didinginkan dan ditimbang beratnya.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Karakteristik Bakteri Pendegradasi Minyak

Isolat-isolat bakteri yang diperoleh dikarakterisasi terlebih dahulu dengan melakukan pengamatan terhadap warna, tepi dan bentuk koloni, pewarnaan Gram dan bentuk sel. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa seluruh isolat memiliki bentuk koloni bulat, tepi rata, dan berwarna putih, putih kekuningan ataupun kuning. Sebagian besar isolat berbentuk batang, kecuali isolat P2 yang berbentuk kokus (bulat). Seluruh isolat memiliki reaksi pewarnaan Gram negatif (Tabel 1).

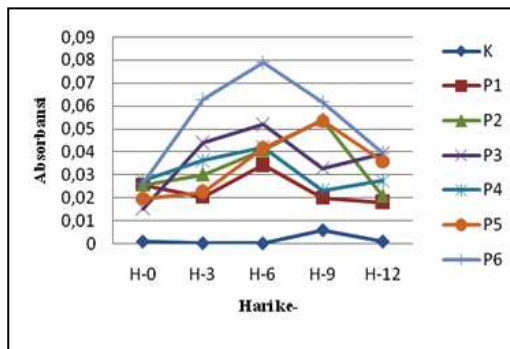
### 3.2. Uji Degradasi Isolat Tunggal

Uji degradasi minyak terhadap 6 isolat yang diperoleh dari tanah tercemar minyak di Kabupaten Siak, Riau, dilakukan dalam 100 ml media BH cair. Uji ini dilakukan untuk mendapatkan isolat yang terbaik untuk kemudian digunakan dalam uji konsorsium.

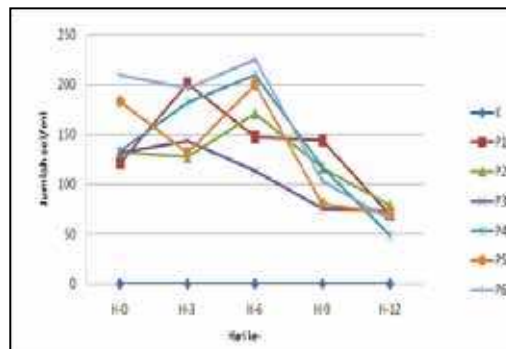
Hasil percobaan menunjukkan terjadi peningkatan kekeruhan pada media dan peningkatan kelarutan minyak dalam media umumnya pada hari ke-3 hingga hari ke-6 pada semua kultur yang diinokulasi (Gambar 1). Hal yang sama tidak terlihat pada perlakuan Kontrol (tanpa penambahan mikroba) dimana media tetap terlihat bening di awal dan akhir percobaan. Hal ini berarti peningkatan kekeruhan dan kelarutan

Tabel 1. Karakteristik koloni dan sel tiap isolat

Isolat	Koloni			Bentuk Sel	Reaksi Gram
	Bentuk	Tepi	Warna		
P1	bulat	rata	putih	Batang	negatif
P2	bulat	rata	kuning	Kokus	negatif
P3	bulat	rata	putih kekuningan	Batang	negatif
P4	bulat	rata	kuning	Batang	negatif
P5	bulat	rata	kuning	Batang	negatif
P6	bulat	rata	kuning	batang	negatif



Gambar 1. Nilai absorbansi media kultur hingga 12 hari setelah inokulasi.



Gambar 2. Jumlah sel pada kultur yang diinokulasi bakteri hingga hari ke-12.

minyak dalam media kultur tersebut disebabkan karena aktifitas metabolisme dari bakteri yang ditambahkan ke dalam media. Aktifitas metabolisme tersebut diantaranya menyebabkan minyak menjadi larut dalam air sehingga meningkatkan kekeruhan media. Nilai absorbansi terbesar di hari ke-6 dijumpai pada perlakuan P6 yaitu sebesar 0.079. Setelah hari ke-6, nilai absorbansi menurun pada semua perlakuan.

Seperti halnya nilai absorbansi media, jumlah populasi sel pada perlakuan isolat juga mengalami peningkatan dari hari ke-0 hingga hari ke-6 (Gambar 2). Setelah itu populasi bakteri terus menurun hingga hari ke-12 pada semua perlakuan penambahan bakteri. Sedangkan pada perlakuan kontrol tidak terdeteksi adanya pertumbuhan bakteri.

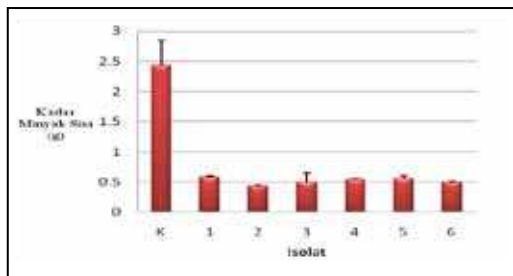
Nilai TPH dari masing-masing isolat ditetapkan pada hari ke-12 dengan cara mengukur jumlah minyak yang tersisa dalam media. Hasil pengukuran gravimetri menunjukkan bahwa nilai TPH dari keenam isolat yang dicoba secara signifikan lebih rendah daripada nilai TPH perlakuan kontrol (Gambar 3). Nilai rata-rata TPH dari keenam perlakuan isolat adalah 0.5 g, sedangkan nilai TPH kontrol adalah sebesar 2.4 g, sehingga terjadi kehilangan bobot minyak sebesar 79% setelah 12 hari inkubasi di media cair. Diantara ke-6 isolat tersebut, nilai TPH yang paling rendah pada hari ke-12 dijumpai pada perlakuan isolat P2 dan P6 yaitu masing-masing sebesar 0.44 dan 0.49

g, atau terjadi penurunan nilai TPH sebesar 82% dan 79%. Nilai TPH pada perlakuan P2 tersebut tidak berbeda nyata secara signifikan dengan nilai TPH perlakuan isolat P6 menurut uji t-test pada taraf 5%.

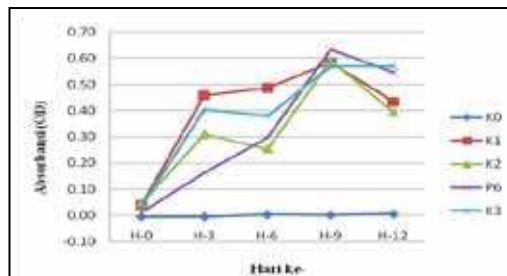
### 3.3. Uji Degradasi Minyak oleh Konsorsium

Dari keenam isolat tunggal yang telah diuji tersebut, kemudian dipilih dua isolat yang dapat menurunkan nilai TPH hingga ke tingkat paling rendah dalam media, yaitu P2 dan P6. Kedua isolat tersebut selanjutnya dikombinasikan membentuk konsorsium untuk melihat kemampuannya mendegradasi minyak (K1). Efektifitas degradasi minyak dari campuran kedua isolat tersebut dibandingkan dengan efektifitas konsorsium enam isolat tunggal yang diuji, masing-masing dengan perbandingan jumlah sel yang sama (K2). Selain itu dibandingkan pula dengan campuran enam isolat tunggal namun populasi sel isolat P2 dan P6 dua kali lebih banyak dibandingkan isolat lainnya (K3). Sebagai pembanding lainnya digunakan isolat P6 dan kontrol (K0, tanpa penambahan mikroba). Pengukuran nilai absorbansi media dan populasi sel dilakukan setiap 3 hari hingga hari ke-12, sedangkan nilai TPH diukur pada hari ke-12.

Nilai absorbansi media dalam kultur untuk semua perlakuan terus meningkat hingga hari ke-9, kemudian mengalami



Gambar 3. Nilai TPH perlakuan isolat tunggal pada hari ke-12. Error bar adalah standar deviasi dari 2 ulangan.



Gambar 4. Nilai absorbansi media kultur pada percobaan konsorsium hingga 12 hari setelah inokulasi.

penurunan pada hari ke-12 (Gambar 4). Nilai absorbansi media tertinggi pada hari ke-9 mencapai 0.63. Nilai absorbansi media pada perlakuan kontrol tidak mengalami perubahan (mendekati nol).

Laju pertumbuhan populasi sel masing-masing konsorsium bakteri dapat dilihat pada Gambar 5. Dari Gambar 5 terlihat bahwa kurva pertumbuhan dari semua konsorsium dan isolat P6 sama. Populasi sel dari seluruh konsorsium yang diuji meningkat hingga hari ke-9, setelah itu populasi menurun pada hari ke-12.

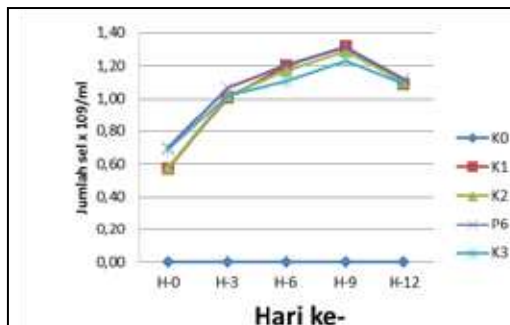
Nilai TPH dari masing-masing konsorsium diukur pada hari ke-12. Nilai TPH dari ketiga konsorsium yang dicoba ataupun isolat P6 secara signifikan lebih rendah daripada nilai TPH perlakuan kontrol yang sebesar 2.7 g berdasarkan uji t-test (Gambar 6). Tingkat penurunan TPH dari perlakuan konsorsium ataupun isolat P6 berkisar antara 67-84%. Diantara ke-3 konsorsium tersebut, nilai TPH yang paling rendah dijumpai pada konsorsium K1 yaitu sebesar 0.43 g, atau terjadi penurunan nilai TPH sebesar 84%. Nilai tersebut tidak berbeda nyata secara signifikan menurut uji t-test ( $P < 0.05$ ) dengan nilai TPH pada K3, yaitu 0.6 g atau terjadi penurunan nilai TPH sebesar 78%. Nilai TPH konsorsium K3 tersebut secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan nilai TPH isolat P6 (0.9 g) atau konsorsium K2 (1.2 g), atau terjadi penurunan nilai TPH masing-masing sebesar 67% dan 57%.

Dari Gambar 6 dapat dilihat bahwa

konsorsium K1 yang terdiri dari kombinasi dua isolat P2 dan P6 menghasilkan nilai TPH lebih rendah dibandingkan dengan konsorsium dari 6 isolat (K2 dan K3) ataupun dengan isolat tunggal P6. Hal ini mengindikasikan bahwa hanya konsorsium mikroba tertentu yang dapat meningkatkan efektivitas penurunan nilai TPH. Beberapa hal yang menyebabkan nilai TPH paling rendah ditemukan pada K1 adalah :

(1) Populasi awal sel yang lebih tinggi. Populasi sel P2 dan P6 pada K1 (masing-masing 50% dari total populasi) lebih tinggi dibandingkan dengan populasi awal isolat-isolat yang sama pada K2 dan K3. Demikian pula populasi isolat P2 dan P6 pada K3 (masing-masing 30% dari total populasi) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat-isolat yang sama pada K2 (masing-masing 17% dari total populasi). Namun demikian, tidak diketahui apakah perbandingan populasi dari isolat-isolat tersebut masih tetap seperti di awal percobaan setelah dikulturkan selama 12 hari. Bila dilihat dari Gambar 5, pertumbuhan sel untuk masing-masing perlakuan menunjukkan tren yang sama. Karena itu perlu penelitian lebih lanjut untuk melihat pengaruh dinamika populasi terhadap efektivitas penurunan nilai TPH.

(2) terjadi sinergi antara isolat P2 dan P6 yang membentuk konsorsium, sehingga efektivitas konsorsium dalam mendegradasi minyak lebih tinggi dibandingkan dengan isolat tunggal P6. Dalam penelitian ini tidak diketahui sejauh mana tingkat sinergi



Gambar 5. Populasi sel pada percobaan konsorsium hingga hari ke-12.

antara kedua isolat dalam menurunkan nilai TPH. Karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat jalur metabolisme dari kedua isolat selama masa percobaan yang mempengaruhi degradasi senyawa hidrokarbon. Dalam percobaan ini juga dapat dilihat bahwa keberadaan isolat lain dapat mempengaruhi efektifitas dari P2 dan P6 (Gambar 6).

#### 4. KESIMPULAN

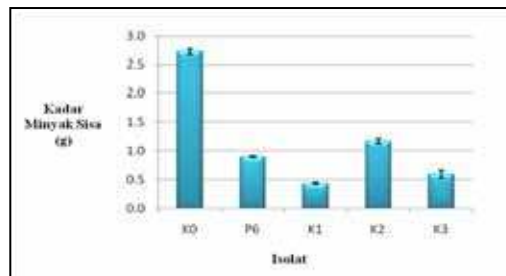
Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa:

Isolat yang paling baik menurunkan nilai TPH setelah 12 hari kultur adalah isolat P2 dan P6.

Perlakuan pemberian isolat tunggal maupun konsorsium dapat menurunkan nilai TPH hingga 67-84%, namun perlakuan konsorsium yang terdiri dari isolate P2 dan P6 paling efektif menurunkan nilai TPH dibandingkan dengan perlakuan isolat tunggal (P6) ataupun konsorsium lainnya (K2 dan K3).

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Udiarto, M. 1992. *Aktivitas Mikroba dalam Degradasi Minyak Bumi*. Prosiding Diskusi Ilmiah VII Hasil penelitian Lemigas. PPPTMGB Lemigas. Jakarta. Vol: 464-475.
2. Kementerian Lingkungan Hidup.



Gambar 6. Nilai TPH perlakuan konsorsium pada hari ke-12. Error bar adalah standar deviasi dari 2 ulangan.

2003. Keputusan Menteri Lingkungan Hidup No. 128 tentang *Tata Cara dan Persyaratan Teknis Pengolahan Limbah Minyak Bumi dan Tanah Terkontaminasi oleh Minyak Bumi secara Biologis*. Jakarta: Kementerian Lingkungan Hidup.

3. Kuhad, R.C. and R. Gupta. 2009. Biological remediation of petroleum contaminants . In Singh, A., R.C. Kuhad and O.P. Ward (Eds.). *Soil Biology Vol. 17. Advances in Applied Bioremediation*. Springer-Verlag, Berlin. 365pp.
4. Hamamura, N., S.A. Olson, D.M. Ward and W.P. Inskeep. 2006. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9):6316-6324.
5. Venosa, A.D., Zhu, X. 2003. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science and Technology* 8(2): 163-178.
6. Rahman, K.S., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M. 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and

- micronutrients. *Bioresource Technology* 90:159-68.
7. Al-Awadhi, H., Al-Hasan, R.H., Ridwan, S.S. 2002. Comparison of the potential of coastal materials loaded with bacteria for bioremediating oily seawater in batch culture. *Microbiological Research* 157:331-336.
  8. Ciawi, Y., Santi, H.C. 2000. *The Effect of Carbon and Nitrogen Ratio and the Presence of Minor Element on the Degradation of Crude Oil by Pseudomonas sp., Arthrobacter sp. and Mycobacterium sp.* Prosiding. International Symposium on Marine Biotechnology. Jakarta.
  9. Cappuccino J.G., Sherman, N. 2005. *Microbiology, A Laboratory Manual 7th Edition*. Pearson-Benjamin Cunningham Publ. 528 hlm.
  10. Bushnell, L.D., Haas, H.F. 1940. The utilization of hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology* 41:653-673.